

論文審査の結果の要旨

氏名：市丸 嘉

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名： Indirubin の生物学的親和性を利用したハイブリッド型抗腫瘍剤の創製

審査委員：(主査) 教授 宮入 伸一

(副査) 教授 飯島 洋 教授 高島 亨

本論文は、新規抗腫瘍剤の創製を目的とした開発研究に関するものである。近年、標的タンパク質中のチロシン残基のヒドロキシ基をリン酸化して細胞機能制御を行うチロシンリン酸化酵素(チロシンキナーゼ)群中の特定酵素の活性阻害を作用機序とする Gefitinib 等の抗腫瘍剤が上市されている。キナーゼを標的とした抗腫瘍剤は特異性の高さから分子標的薬に分類されており、その多くはチロシンキナーゼ阻害剤である。なお、キナーゼ阻害を作用機序とする分子標的薬はキナーゼの活性中心にある ATP 結合ドメインに対して親和性を示し、ATP の結合を阻害する。著者は、細胞増殖や細胞周期回転に深く関与しているグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3β (GSK-3β)やサイクリン依存性キナーゼ(CDK)に着目し、それらの特異的阻害剤をベースとした抗腫瘍剤の開発を行った。これらキナーゼは、標的タンパク質中のセリンあるいはスレオニン残基のヒドロキシ基をリン酸化するセリン/スレオニンキナーゼであり、キナーゼカスケード上ではチロシンキナーゼの下流に位置するためより特異的な細胞機能阻害の誘発が期待でき、副作用の点から有利と考えられている。本論文において、著者は酵素阻害力の向上の面から酵素活性中心における共有結合形成が作用の持続化・強力化に有用と考え、生体成分との共有結合形成が報告されているエポキシド構造に着目し、前述のキナーゼ阻害物質と組み合わせたハイブリッド化合物の合成を行い、その抗腫瘍活性・反応性及び代謝様式を検討した。なお、本論文では抗腫瘍活性が報告されている indirubin (I)の誘導体である indirubin 3'-oxime (II)およびその臭素置換体をベースとしているが、これら化合物の中のいくつかは GSK-3βや CDK の ATP 結合ドメインへの親和性及び高い酵素活性阻害能を示すことが知られている化合物でもある。

第1章では、プロトタイプとして indirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (III)を合成し、ヒト肝がん由来細胞(HepG2 細胞)を用いた細胞傷害活性、生体成分との反応の可能性、代謝様式および代謝産物の細胞傷害活性等を検討し、その抗腫瘍剤のリード化合物としての有用性を明らかにした。化合物 III は、化合物 II に epibromohydrin を作用させて製した。なお、本化合物は新規物質である。化合物 III の HepG2 細胞に対する細胞傷害は用量依存的に増大し、IC₅₀値は 1.7 μM を示した。この値を母化合物である化合物 II のそれ(15 μM)と比較し、著者はエポキシド基の導入が細胞傷害活性の著しく改善に寄与することを明らかにした。また、この値は強力な抗腫瘍効果を示す *cis*-platin (IC₅₀値 : 4.0 μM)とほぼ同等であることも指摘している。次いで、GSK-3βの活性中心ではシステイン残基が重要な役割を担っていることから thiol 基との反応性を検証した。ここでは、モデル化合物として 2-mercaptoethanol を使い、化合物 III のエポキシド基部分が thiol 基と共有結合性の安定付加体(IV)を形成することを明らかにし、本化合物が酵素の活性中心でシステイン残基と化学的に安定な付加体を形成する可能性を示した。引き続き、HepG2 細胞から調製した細胞融解液を用いて代謝様式を検討した。著者は HPLC 及び UPLC-MS を駆使して代謝物を検索し、有機溶媒抽出画分中にエポキシド部分の加水分解物(V)を唯一の有機溶媒可溶性代謝物として同定した。さらに別途合成した化合物 V を用いて細胞傷害活性を化合物 III と比較検討し、終濃度 3 μM において短時間培養(24 時間)では両者間で大きな差異は認められないものの、長時間培養(72 時間)では化合物 II でのみ細胞傷害活性が維持されることを確認した。以上の結果から、著者はキナーゼの ATP 結合ドメインに親和性をもつ阻害剤とアミノ酸残基との共有結合能を有するエポキシド基の様な官能基とのハイブリッドは、抗腫瘍剤開発において有用な方法論であると結論した。

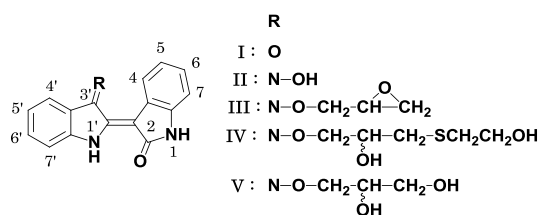


Fig. 1. Indirubin 誘導体の構造

第2章では、化合物 **III** の芳香環上の様々な位置に臭素原子を一つあるいは二つ導入した臭素置換体を合成し、それらの細胞傷害活性を比較検討して抗腫瘍剤としての活性向上を図ると共にその前駆物質である化合物 **II** の臭素置換体における構造活性相関を、細胞傷害活性を指標として検討した。また、前章に倣いエポキシド誘導体の長時間培養(72 時間)における臭素導入の効果及び代謝への影響についても検討した。3'-oxime 体(**II**)の臭素置換は、細胞傷害活性及び GSK-3 β や CDK への親和性に大きく影響することが知られているが、従前の報告は個別の臭素置換体に関する知見であり、細胞傷害活性について臭素置換体を網羅的に扱った例はない。著者は、化合物 **II** の臭素置換体 13 種(5-Br; 6-Br; 7-Br; 5'-Br; 6'-Br; 5,6-Br₂; 5,7-Br₂; 5,5'-Br₂; 5,6'-Br₂; 6,5'-Br₂; 6,6'-Br₂; 7,5'-Br₂; 7,6'-Br₂)を調製し、その全てをエポキシド誘導体に変換した。細胞傷害活性は HepG2 細胞を用いて評価し、エポキシド誘導体及び 3'-oxime 誘導体における臭素置換位置の構造活性相関を短時間培養(24 時間)時の IC₅₀ 値を基に検討した。化合物 **III** の 5 位臭素置換体(**VI**)では、IC₅₀ 値が母化合物の約 1/3 の 0.62 μ M であり、臭素原子導入による細胞傷害活性の向上が確認された。また、他の一置換体では、6 位、7 位への臭素原子の導入は細胞傷害活性を大きく減少させ、5 位、6 位への導入でも若干の減少が認められ、二置換体では、5,6 位、5,5'位への導入では大きな変動は認められなかったが、5,7 位、7,5'位への導入で IC₅₀ 値が母化合物の 5~6 倍の値となり細胞傷害活性の低下が観察された。なお、他の四つの二置換体では細胞傷害活性は消失した。以上の結果から、著者はエポキシド誘導体の場合には 5 位への臭素原子の導入は細胞傷害活性向上に寄与するが、他の部位への導入は好ましくないと結論した。一方、3'-oxime 体(**II**)の一置換体では、5 位、6 位、7 位への臭素原子の導入により細胞傷害活性が 2~3 倍程度向上したが、5'位、6'位への導入では大きな影響は認められなかった。しかし、二置換体になると 5,6'位、6,6'位、7,6'位誘導体の場合には細胞傷害活性が低下し、前述の一置換体における 5 位、6 位、7 位への導入効果が 6'位への臭素原子の導入により打ち消されることが判明した。また、他の二置換体では 6,5'位置置換体で 5 倍弱の細胞傷害活性向上が認められ、5,6 位では 3 倍強、7,5'位では 3 倍程度、5,7 位および 5,5'位では 2 倍程度であった。これらの結果から著者は、3'-oxime 誘導体における細胞傷害活性の向上には 6,5'位への臭素原子の導入が最も有利であると結論した。次いで、化合物 **VI** について培養時間と細胞傷害活性の関係を検討し、長時間培養(72 時間)においては化合物 **III** と同じ 3 μ M 添加時に加えて終濃度 1 μ M でも細胞傷害活性が維持されることを認めた。これは本化合物の IC₅₀ 値が母化合物の 1/3 であったことと良く相関する結果である。引き続き前章に倣い代謝様式を検討し、化合物 **VI** の場合もエポキシド部分の加水分解物が唯一の有機溶媒可溶性代謝物であることを示した。さらに、化合物 **VI** と化合物 **III** の減衰速度を比較し、5 位に臭素原子を導入することで代謝速度が低下することを明らかにし、代謝速度低減が細胞傷害活性の維持及び IC₅₀ 値の低下をもたらす主要因子である可能性を示唆した。

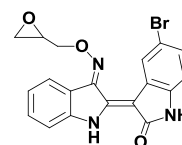


Fig. 2. 化合物 **VI** の構造

以上、本論文は、著者が開発した新規抗腫瘍剤の特性を明らかにすると共に細胞傷害活性の向上のための因子にも言及しており、今後の抗腫瘍剤開発に寄与することが期待できるものである。

よって本論文は、博士(薬学)の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成28年1月15日